

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年7月24日 (24.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/060126 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12,
C07K 14/515, C12Q 1/68, G01N 33/566, A61K 45/00,
38/17, 48/00, A61P 29/00須磨区清水台 1-9-3-2-1 9 1 2 Hyogo (JP). 中務
美紀子 (NAKATSUKASA, Mikiko) [JP/JP]; 〒719-0302
岡山県 浅口郡 里庄町大字新庄 2 8 6 9 Okayama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00089

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒530-0041 大阪府 大
阪市 北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル
原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2003年1月8日 (08.01.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-5326 2002年1月11日 (11.01.2002) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 塩澤 俊一 (SHIOZAWA, Shunichi) [JP/JP]; 〒
651-2274 兵庫県 神戸市 西区竹の台 2 丁目 1 1-6
Hyogo (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 駒井 浩一郎
(KOMAI, Koichiro) [JP/JP]; 〒654-0123 兵庫県 神戸市

[続葉有]

(54) Title: RHEUMATOID ARTHRITIS DISEASE SENSITIVE GENE, ITS PROTEIN, METHOD AND KIT OF JUDGING THE
ONSET OF RHEUMATOID ARTHRITIS USING THE SAME, AND METHOD AND DRUGS FOR TREATING RHEUMATOID
ARTHRITIS(54) 発明の名称: 慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、そのタンパク質、それらを利用した慢性関節リウマチの
発症可能性の判定方法および判定キット、並びに、慢性関節リウマチの治療方法及び治療薬剤(57) Abstract: A gene comprising the amino acid represented by SEQ ID NO:1 and having a glycine insertion mutation as the 269th
amino acid in the sequence is identified as an RA disease sensitive gene on human 8th chromosome. Moreover, it is clarified that
the mutation in this gene and its protein relates to the onset of RA so as to establish a method of highly accurately judging the onset
of RA or the onset risk thereof, etc.

(57) 要約:

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第 269 番
目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする
遺伝子を、ヒト第 8 染色体上の RA 疾患感受性遺伝子と同定した。また、
この遺伝子およびタンパク質の変異が RA の発症に関係していることを
明らかにし、この変異を利用して RA の発症またはその発症可能性を高
精度に判定する方法などを確立した。



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、そのタンパク質、それらを利用した慢性関節リウマチの発症可能性の判定方法および判定キット、並びに、慢性関節リウマチの治療方法及び治療薬剤

技術分野

本発明は、慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、及びその利用に関し、具体的には、当該遺伝子またはその翻訳産物たるタンパク質の変異の有無を検出することなどを特徴とした慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の新たな判定方法および判定キット等を提供するものである。さらに、本発明は、当該リウマチの治療方法およびその治療薬剤に関するものである。

背景技術

慢性関節リウマチ（rheumatoid arthritis、以下「RA」ともいう）は、多発するびらん性関節炎を主徴とするが、同時に多臓器を障害する原因不明の全身性炎症疾患である。RAは寛解と増悪とを繰り返しながら慢性に進行し、無治療で放置すると関節の破壊や変形を来し、やがて運動器の機能障害を呈してくる。時には生命をも脅かす。したがって、RA患者は身体的にも精神的にも大きな苦痛を生涯に亘って背負うことになる。

RAは、その発症の仕方も多種多様であり、その診断には、アメリカリウマチ学会の診断基準が広く利用されている。しかしながら、RAの

発症は、通常、緩徐で数週間から数ヶ月にわたり、アメリカリウマチ学会の診断基準における客観的な指標としてのリウマトイド因子の存在は、その陽性率が3ヶ月以内で33%、12ヶ月以上においても88%程度（治療、第73巻、第3号、第23～27頁、1991年）であり、RAと確実に診断するには至っていない。そこで、組換え抗原と反応する患者血清中のリウマチ性関節炎関連抗体IgM抗体を検出し、リウマチ性関節炎を診断しようとする試みなどがなされている（日本国特許出願、特表平10-513257号公報（公表日：平成10年12月15日）参照）。

また、RAの治療は、通常RA病態の病状の進行過程によって選択すべき治療手段が異なる。一般的に確定診断が下せない初期では、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）を投与し、確定診断が下せた場合は、NSAIDに加えて疾患修飾性リウマチ薬（DMARD）を投与する。特にRA発症の初期には、確定診断を下すことは困難であり、現状では、NSAIDを投与し、経過を慎重に観察しながら膠原病を含む他のリウマチ疾患との鑑別を同時に行っている。さらに症状が進行した場合は、ステロイド薬の投与を行う場合もあり、疼痛のための薬物療法と共に関節機能の維持・回復に対して理学療法・装具療法を行う。また、関節破壊により日常生活が不自由になった場合には、手術療法を行う場合もある。

RAの原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は、種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、RAは生活環境を含めた多数の原因因子が重なり合ってはじめて疾患へと発展・増悪する疾患である。そのため、疾患の正しい解明と適切な治療とを行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかにされなければならない。RA

は、世界的には罹患率 1 % 以下の疾患であるが（ニュー・イングリランド・ジャーナル・オブ・メディシン（N. Engl. J. Med.）、第 322 巻、第 1277～1289 頁、1990 年）、患者の同胞では約 8 % 以上が発症する（セル（Cell）、第 85 巻、第 311～318 頁、1996 年）ことから、その原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。また、環境も原因因子の 1 つと考えられていることから、あらかじめ発症可能性を知ることにより、日常生活において、例えば、食餌、ウイルス感染およびストレス等に注意することにより発症を遅らせたり防ぐことが可能である。さらに、診断を早め、早期に適切な治療を行うことによって RA の進行を遅らせることが可能であり、予後の改善が期待される。

国際公開 W098/51791 号（国際公開日：平成 10 年 11 月 19 日）の開示内容によれば、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を RA 患者およびその血縁者に対して実施することにより、慢性関節リウマチの疾患遺伝子が位置する 3 カ所の遺伝子座を特定し、以下の疾患遺伝子を同定している。

（1）ヒト第 1 染色体の、マイクロサテライトマーカー D1S214 および／または D1S253 がハイブリダイズする DNA 配列から ±1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

（2）ヒト第 8 染色体の、マイクロサテライトマーカー D8S556 がハイブリダイズする DNA 配列から ±1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

（3）ヒト X 染色体の、マイクロサテライトマーカー DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227 および／または DXS1232 がハイブリダイズする DNA 配列から ±1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患

遺伝子。

このように、慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子座は第1、第8、およびX染色体上に存在することが明らかにされている。このうち、第1染色体およびX染色体についてはこれまでにRAの疾患感受性遺伝子が同定されているものの、第8染色体においてはRAの疾患感受性遺伝子は未だ同定されていない。

そこで、本発明は、ヒト第8染色体上に存在する慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子を同定し、その遺伝子またはその翻訳産物であるタンパク質の変異の有無を検出することにより、RAの発症またはその発症可能性を高精度に判定（診断）する方法、およびその判定（診断）キットを提供することを課題とするものである。さらに、本発明は、上記慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子に変異を持つRA患者に対する有効な治療方法および治療薬剤を提供することを課題とするものである。

発明の開示

本願発明者は、上記課題に鑑み、ヒト第8染色体について複数のマイクロサテライトマーカーを用いた詳細な遺伝子マッピングを行い、RA関連遺伝子座位を決定した。さらに、その近傍に位置するAngiopoietin-1遺伝子についてRA疾患感受性遺伝子としての可能性を検討したところ、当該遺伝子に3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在すること、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたとき、RA患者と健常者との間で有意差が認められたこと、および、RA患者では健常者に比べ有意にmRNA発現量が低いこと、を各実験により明らかにした。

これらの知見より、被験者から得られた細胞における上記遺伝子およびその翻訳産物たるタンパク質の変異の有無を指標としたRAの発症またはその発症可能性の判定（診断）方法、および判定（診断）キットが有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな治療方法および治療薬剤としても有用である。

以下、本発明について詳述するが、本明細書において、特に断らない限り、A、C、GおよびTは、アデニン、シトシン、グアニンおよびチミンの各塩基を示す。また、アミノ酸およびアミノ酸残基は、IUPACおよびIUBの定める1文字表記または3文字表記を使用する。

本発明に係る遺伝子は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子である。本発明に係る遺伝子としては、具体的には、配列番号2に示される塩基配列を有し、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基挿入変異を持ったAngiopoietin-1遺伝子を例に挙げることができる。上記第805～807番目の塩基は、Angiopoietin-1遺伝子のcDNAとしてジェンバンクに登録されている塩基配列（アクセッション番号U83508）の第1114～1116番目の塩基に相当する。

上記「遺伝子」とは、少なくともゲノムDNA、cDNA、mRNA等のポリヌクレオチドを含む意味であり、本発明に係る遺伝子としては、上記Angiopoietin-1遺伝子のcDNAのほか、このcDNAの塩基配列に対応する塩基配列を有するmRNAや、このmRNAの転写元のゲノムDNAなどが含まれる。また、上記「遺伝子」とは、2本鎖DN

Aのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAやRNAを包含する。さらに、上記「遺伝子」は、翻訳領域以外に、非翻訳領域（UTR）の配列やプロモーター配列、ベクター配列（発現ベクター配列を含む）などの配列を含むものであってもよい。

本発明に係るタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質である。このタンパク質は、上記 Angiopoietin-1 遺伝子の翻訳産物であり、さらに付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、His タグ等によって当タンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

上記 Angiopoietin-1 は、Angiopoietin・Family に属する因子であり、血管の形成に重要な役割を果たすとされている。血管新生関連 tyrosine kinase 型レセプターには VEGF receptor family と TIE receptor family とがあり、RA 患者において VEGF 過剰産生が報告されている (Ann Rheum Dis: 59: i65-71, 2000 参照)。Angiopoietin-1 は、TIE2 receptor のリガンドであり、VEGF と相補的に機能して血管損傷および出血を抑制する効果をもつことが知られている (Nature Medicine: Vol. 6: 460-463: 2000 参照) が、病態との関連は不明な部分が多かった。

本願発明者は、前述のように詳細な遺伝子マッピングを行った結果、マイクロサテライトマーカー D8S556 に連鎖性を見出し、これが以前行った連鎖解析の結果と一致したことより当位置がヒト第8染色体上 RA 疾患感受性遺伝子座位であると考えた。

上記 D8S556 はヒト第 8 染色体上長腕領域にマップされるが、この領域のマウスでの相同領域に当たる第 15 染色体上の領域には関節炎感受性遺伝子 *Paaml* が存在することが報告されている(リウマチ 40(5):833-848, 2000 参照)。また、上記 D8S556 は 584.52-584.72cR に位置することが明らかになっており(リウマチ vol.39:P445, 1999 参照)、Angiopoietin-1 は GB4 Map で 589.07cR にマップされることから、Angiopoietin-1 は、疾患感受性遺伝子候補として染色体上の位置からも妥当であると考えられる。

さらに、RA 患者の滑膜および末梢血から単離した遺伝子解析の結果、上記 Angiopoietin-1 遺伝子に 3 塩基挿入型および 3 塩基欠失型の 2 種類が存在することを見出した。以下、遺伝子配列上のこの 3 塩基挿入位置および 3 塩基欠失位置を、単に「変異位置」という。同様に、この遺伝子配列上の変異位置に対応するアミノ酸配列上のグリシン挿入位置およびグリシン欠落位置を、単に「変異位置」という。

なお、上記 3 塩基欠失については、human cell line T98G においても報告されている(Cell. Vol.87:1161-1169, 1996 参照)。

Angiopoietin-1 は、VEGF と相補的に作用して血管網の形成を増強する。具体的には、VEGF は血管新生における重要な促進因子であり内皮細胞の遊走と増殖とを促す。一方、この内皮細胞の遊走と増殖とは Angiopoietin-1 により調節される因子によって停止し、新しい血管基底膜が形成されることにより成熟した血管が構築される。事実 VEGF のみによって実験的に誘導された血管は未熟で出血しやすく、RA では VEGF 過剰産生が報告されている(Ann Rheum Dis: 59: i65-71, 2000 参照)が Angiopoietin-1 についての知見はない。本願発明者は、

Angiopoietin-1 の mRNA 発現量を R A 患者と健常者とで比較したところ、R A 患者の末梢血中 mRNA 発現量が有意に低いことが明らかになった。これより、R A では未熟な血管の増殖が起こることによって、血中からの免疫細胞の漏出による慢性炎症展開に関与している可能性が考えられる。

本発明に係る遺伝子およびタンパク質は、以下詳述するように、R A の発症またはその発症可能性を判定する新たな判定方法および判定キットに有用である。

(1) R A の発症またはその発症可能性の判定方法

本発明に係る R A の発症またはその発症可能性の判定方法（換言すれば、R A の診断方法）において、本発明に係る遺伝子として、①ゲノム DNA を用いた場合、②mRNA（cDNA）を用いた場合を順番に説明し、その後、③本発明に係るタンパク質を用いた場合について説明する。

①ゲノム DNA を用いた場合

ゲノム DNA を用いた本判定方法は、例えば次のようにして実施できる。

被験者のゲノムは、常法により人体の全ての細胞より得ることが可能であるが、例えば、毛髪、各臓器、末梢リンパ球、滑膜細胞などから得ることができる。また、得られた細胞を培養し、増殖したものから得ることもできる。さらに、得られたゲノムは、例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）法、NASBA（Nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（Transcription-mediated amplification）法およびSDA（Strand Displacement Amplification）法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅して使用することができる。

ゲノム上の変異の有無の検出方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、アリル特異的オリゴヌクレオチドプローブ法、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (Oligonucleotide Ligation Assay) 法、PCR-SSCP法、PCR-CFLP法、PCR-PHFA法、インベーター法、RCA (Rolling Circle Amplification) 法、プライマーオリゴベースエクステンション (Primer Oligo Base Extension) 法などが挙げられる。

例えば、ゲノムから、遺伝子上の上記変異位置を含む領域を増幅後、得られるPCR産物をサブクローニングし、これをダイレクトシーケンスすることによってゲノム上の変異の有無を検出できる。

また、遺伝子上の上記変異位置を含む領域をオリゴヌクレオチドプローブに用いることによって、ゲノム上の変異の有無を検出できる。このようにプローブに用いる場合としては、例えば、上記変異位置を含む塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをチップ上に固定してDNAチップを構成し、当該DNAチップを上記変異の有無の検出用に用いるような場合が挙げられる。この場合、オリゴヌクレオチドプローブの長さとしては、上記変異位置を含む7～50ヌクレオチド、あるいは10～30ヌクレオチドが好ましく、15～25ヌクレオチドがより好ましい。

また、ゲノム上の変異の有無は、適当な制限酵素を使用し、切断されるゲノム断片のサイズの違いをサザンブロットィングなどで検出することによっても検出することができる。

このように、ゲノム上の変異を検出することにより、被験者のRAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。具体的には、後述するように、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロお

よび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたときRA患者と健常者との間で有意差が認められたことから、3塩基欠失型ホモが検出された場合は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は低く、一方、ヘテロおよび特に3塩基挿入型ホモが検出された場合は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は高いと判定することができる。

尚、上記判定方法により使用されるプライマーおよびプローブは、常法により、DNAシンセサイザーなどにより作製することができる。

② mRNA (cDNA) を用いた場合

mRNAを利用する場合、例えば、被験者の細胞より抽出したmRNAから逆転写反応によってcDNAを作製し、上記変異位置を含む領域を増幅後、上記と同様、増幅断片の塩基配列を直接シーケンスすることにより、またはDNAチップを用いることにより、あるいはRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いることにより、上記変異の有無を検出できる。

上記変異位置を含む領域の増幅に用いるプライマーとしては、特に限定されるものではないが、例えば、以下のプライマーの組み合わせによりcDNAを鋳型とした増幅反応が可能である。

センスプライマー：5'-GCTGGCAGTACAATGACAG-3' (配列番号3)

アンチセンスプライマー：5'-TCAAAAATCTAAAGGTCGAAT-3' (配列番号4)

このように、mRNA (cDNA) 上の変異を検出することにより、上記と同様、被験者のRAの診断 (発症またはその発症可能性の判定) を高精度に行うことができる。

なお、mRNAを利用してRAの発症またはその発症可能性を判定す

るもう一つの方法としては、配列番号2に示す塩基配列において、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基挿入変異を持たない塩基配列を有する慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子由来のmRNA（即ち、3塩基欠失型のAngiopoietin-1のmRNA）の発現量を測定する方法がある。

より具体的に言えば、上記の判定方法は、上記3塩基欠失型mRNAの発現量に対して2つの閾値1、閾値2（但し、閾値1<閾値2）を設け、上記mRNAの発現量が上記閾値1以下であれば、RAを発症している可能性が高い、または将来発症する可能性が高いと判定し、上記閾値2以上であれば、RAを発症している可能性は低い、または将来発症する可能性は低いと判定することを特徴とするものである。このRAの発症またはその発症可能性を判定する方法に用いられるmRNAの発現量の測定には、従来公知のRT-PCR法などを用いることができる。

③タンパク質を用いた場合

被験者の細胞より調製したタンパク質を利用する場合、配列番号1のアミノ酸配列において上記変異位置におけるグリシン挿入の有無を検出する方法が挙げられる。このグリシン挿入の有無の検出は、通常のタンパク質のシーケンス方法に準ずればよいが、例えば、グリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法で検出する方法、タンパク質を単離し、直接または必要に応じ、酵素等で切断し、プロテインシーケンサーを利用して変異を検出する方法、アミノ酸の等電点の変異を検出する方法および質量分析により質量の差を検出する方法が挙げられ、好ましくは、グリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA法で検出する方法が挙げられる。

このように、上記変異位置におけるグリシン挿入の有無を検出することにより、被験者のRAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。具体的には、後述するように、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたときRA患者と健常者との間で有意差が認められたことから、グリシン挿入型タンパク質が検出されなかった場合（換言すれば、グリシン欠落型タンパク質しか検出されなかった場合）は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は低く、一方、両方のタンパク質が検出された場合および特にグリシン挿入型タンパク質のみが検出された場合は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は高いと判定することができる。

（2）RAの発症またはその発症可能性の判定キット

本発明に係るRAの発症またはその発症可能性の判定キット（換言すれば、RAの診断キット）は、上記の変異を検出できる試薬、例えば、プライマー、プローブ、抗体などを含むものであれば特に限定されず、さらにその他の試薬を組み合わせることにより得ることができる。

例えば、ゲノム上およびmRNA（cDNA）上の変異の有無を検出するキットとしては、上記変異位置を含む領域を増幅できるように設計されたプライマーを含み、さらに、上記変異の有無を検出できるように設計されたプローブ、制限酵素、マクサムギルバート法およびサンガー法などの塩基配列決定法に利用される試薬など、変異を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせたキットが挙げられる。なお、かかる試薬は、採用される検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば、dATP、dUTP、dTTP、dGTP、DNA合成酵素、RNA合

成酵素等を挙げることができる。さらに、変異の検出の妨げとならない適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

プライマーを含むキットの場合、プライマーは、上記変異位置を含む領域を増幅できるものであれば特に限定されるものではなく、例えば上記配列番号3および4に示される一組のプライマーセットを挙げることができる。

また、タンパク質上の変異の有無を検出するキットとしては、例えばグリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を含むキットなどが挙げられる。

これらの判定キットを使用することにより、前記したように、RAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。

（3）RAの治療方法および治療薬剤への正常型タンパク質などの利用

このように、Angiopoietin-1 遺伝子上の3塩基挿入変異（および、これに対応するアミノ酸配列上のグリシン挿入変異）は、RAの発症原因の一つと考えられ、したがって、Angiopoietin-1 に上記グリシン挿入変異を持つRA患者に正常型タンパク質（即ち、グリシン欠落型タンパク質）を補完することは、RAの治療法として有効であると考えられる。そこで、本発明は、以下のRAの治療方法および治療薬剤を提供するものである。

・上記グリシン挿入変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者に、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を補完

することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。

・上記グリシン挿入変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者の治療に用いられる治療薬剤であって、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を主成分とする慢性関節リウマチの治療薬剤。

正常型タンパク質の補完方法は特に限定されるものではなく、例えば、公知のタンパク質発現系や遺伝子導入方法などを用いることができ、具体的には、哺乳細胞にタンパク質を発現させる場合に用いる発現ベクターやウイルスベクターなどを用いた方法が挙げられる。また、前述のように、Angiopoietin-1は、TIE2 receptorのリガンドであることから、このTIE2 receptorのアゴニストとして作用する低分子化合物を経口または静注などによって体内に投与することもRAの治療法として有効であると考えられる。なお、ここでいう低分子化合物とは、ペプチドなどのタンパク質を含む。

また、上記正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNAと、上記TIE2 receptorのアゴニストとしての低分子化合物とは、治療薬剤として択一的に使用されるだけでなく、組み合わせて使用することも可能である。

図面の簡単な説明

図1は、本実施例において、6種のマイクロサテライトマーカーを用いて行った遺伝解析の結果を示す表である。

図2は、本発明に係るRA関連遺伝子を模式的に示した概略図である

。なお、図2中でA. およびB. には、本実施例において使用されるプライマーおよびプローブの設定位置を示す。

図3(a) 及び図3(b) は、本実施例において、RA関連遺伝子の3塩基挿入変異位置を含む領域のシーケンス解析を行った結果を示す図である。図3(a) は、3塩基挿入型のシーケンス解析結果であり、図3(b) は、3塩基欠落型のシーケンス解析結果である。

図4は、本実施例において、RA患者および健常者において、3塩基挿入変異の有無の検出を行った結果を示す表である。

図5は、本実施例におけるmRNAの発現量の定量結果を示すグラフである。

図6は、3塩基挿入型 (Ang1) 及び3塩基欠失型 (Ang1(del3)) のHUVCE細胞の遊走能を測定した結果を示すグラフである。

発明を実施する最良の形態

本発明の実施の一形態について、図1～図6に基づいて説明すれば以下のとおりである。なお、本発明はこの記載に限定されるものではない。

(1) マイクロサテライトマーカーによる遺伝解析

患者2名、健常者1名を1家系とした33家系において鎖長解析を行った。末梢血から抽出したDNAから、第8染色体上の上記マイクロサテライトマーカーD8S556近傍10.8 cM中にあるヘテロ接合度0.7以上のD8S176、D8S521、D8S1738、D8S556、D8S1830およびD8S539の各マイクロサテライトマーカーを、蛍光ラベルプライマーを用いたPCR法によって増幅し、AB

I 3 7 7 型シーケンサーで 3 0 0 0 V、2 時間電気泳動した。そして、GeneScan(ver. 2. 0. 2)を用いてマーカーのサイズを決定し、MAPMAKER/SIBS(ver. 2. 1) (Complete multipoint sib-pair analysis of quantitative and qualitative traits. Am. J. Hum. Genet. 57:439, 1995参照)を用いて、罹患同胞対検索法にもとづいた 2 点解析によって最大連鎖性尤度(Maximum Lod Score)を算出した。

結果を図 1 の表に示す。同図に示すように、D 8 S 5 5 6 において Lod 値は最大単独頂値 1. 3 5 を示した。この結果より、本発明に係る R A 関連遺伝子は、マイクロサテライトマーカー D 8 S 5 5 6 との連鎖性が見出された。また、D 8 S 5 5 6 の近傍には、血管新生に関与する遺伝子 Angiopoietin-1 が位置すること等から、上記 Angiopoietin-1 が R A 疾患感受性遺伝子の候補遺伝子であると考えられた。

(2) Angiopoietin-1 cDNA のシーケンス解析

R A 患者の滑膜細胞および末梢血単核球分画より調製したトータル R N A から Oligo dT プライマーを用いた逆転写反応 (GeneAmp RNA PCR Kit) (アプライドバイオシステムズ) により cDNA を合成した。そして、Angiopoietin-1 遺伝子領域 1 5 0 8 b p を増幅後、ダイターミネーター法によりシーケンス解析を行った。なお、上記の反応に使用したプライマーは、以下に示すとおりである。

センスプライマー-AngF1.5: 5'-GCTGGCAGTACAATGACAG-3' (配列番号 3)

アンチセンスプライマー-AngR1.5: 5'-TCAAAAATCTAAAGGTCGAAT-3 (配列番号 4)

また、上記センスプライマー-AngF1.5 および上記アンチセンスプライマー-AngR1.5 の設定位置については、図 2 中の A. に示すとおりである。なお、Angiopoietin-1 分子内には、図 2 に示されるように、coiled-

coil ドメインおよびフィブリノーゲン様ドメインが存在する。

シーケンスにより決定した cDNA 配列は、Angiopoietin-1 遺伝子の既報配列(アクセッション番号 U83508)と比較された。その結果、Angiopoietin-1 遺伝子においては、前述のとおり、3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在することが見出された。配列番号2には、このうち3塩基挿入型の遺伝子配列が示される。この3塩基挿入型では、配列番号2に示されるように、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基が挿入されている。

図3(a)及び図3(b)には、変異位置を含む領域のシーケンス解析結果が示される。同図(a)は3塩基挿入型の解析結果であり、同図(b)は3塩基欠失型(3塩基欠落型)の解析結果である。なお、図3(a)及び図3(b)は、各遺伝子配列の相補配列をシーケンス解析した結果を示すものである。したがって、同図(a)より、3塩基挿入型では、「GGT」の3塩基挿入(相補配列では「ACC」の3塩基挿入)が生じていることが確認でき、同図(b)より、3塩基欠失型では、この3塩基が欠落していることが確認できる。

上記3塩基挿入型遺伝子の翻訳産物であるタンパク質は、配列番号1に示されるように、そのアミノ酸配列中第269番目のアミノ酸としてグリシンが挿入されている。一方、上記3塩基欠失型遺伝子の翻訳産物であるタンパク質においては、この第269番目のグリシンが欠落している。

(3) RA患者および健常者(RA未発症者)における上記変異の有無の検出

患者本人以外の親族にRA患者がいる家系(以下RA家系と称する)

のRA患者およびRA家系の健常者、患者本人以外の親族にRA患者がいない家系（以下孤発家系と称する）のRA患者および孤発家系の健常者それぞれについて、上記3塩基挿入変異の有無の検出を行った。

上記の検出は、各被験者よりゲノムDNAを抽出し、上記変異位置を含む領域を適当なプライマーを用いたPCR反応により増幅し、得られたPCR産物をシーケンス解析することにより実施した。なお、上記適当なプライマーとしては、上記3塩基挿入変異を含む領域を増幅することが可能なセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを任意に使用することができる。また、上記適当なプライマーの長さは、ミスマッチによる標的領域以外の増幅が起こらない限りにおいて特に限定されない。一般には、15から25ヌクレオチドの範囲内の長さのプライマーが用いられる。その一例として、上記センスプライマーおよび上記アンチセンスプライマーには、以下に示すオリゴヌクレオチドが挙げられる。

センスプライマー：5'-CAACCTTGTC AATCTTTGC-3'（配列番号5）

アンチセンスプライマー：5'-ACACCTTTT TGGGTTCTGGC-3'（配列番号6）

上記の方法による変異の検出結果を、図4に示す。なお、図4の表中において、Familial RAはRA家系のRA患者、Familial not RAはRA家系の健常者、Sporadic RAは孤発家系のRA患者、Sporadic not RAは孤発家系の健常者を示す。また、nは各種被験者の全体数を示し、正常型遺伝子をホモで有する者（図中では「nt805 (del 3) ホモ」と示す）、変異型遺伝子をヘテロで有する者（図中では「nt805 (del 3) ヘテロ」と示す）、変異型遺伝子をホモで有する者（図中では「nt805 ホモ」と示す）の数をそれぞれの欄に示している。さらに、括弧内には、

各種被験者における上記それぞれの者の割合を示す。

図4に示すように、RA家系および孤発家系ともに、RA患者のみが上記3塩基挿入型遺伝子をホモで有することが確認された。また、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたとき、孤発家系RA患者と孤発家系健常者との間、および、孤発家系RA患者とRA家系健常者との間でそれぞれ有意差が認められた。このことから、上記変異の有無は、RA発症に関係することが確認された。

したがって、上記の方法を利用して上記RA関連遺伝子に3塩基挿入変異が生じているか否かの判定を行うことにより、RAを発症しているか、あるいは、RAの発症可能性を有しているかの判定を行うことができる。具体的には、例えば、ある被験者について上記のような方法により上記3塩基挿入変異の検出を行い、変異型遺伝子のみが検出された場合（すなわち、変異型遺伝子をホモで有する場合）および変異型遺伝子および正常型遺伝子の両方が検出された場合は、RAを発症している可能性が高いと判定することができる。また、上記の検出の結果、変異型遺伝子が検出されなかった場合（すなわち、正常型遺伝子をホモで有する場合）は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は低いと判定することができる。なお、本発明に係る判定方法は、上述の方法に限定されるものではなく、上記の検出データに基づいて適宜選択することができる。

（4）上記RA関連遺伝子のmRNAの定量

RA患者21名、健常者18名を対象にしてTaqMan EZ RT-PCRキット（アプライドバイオシステムズ）を用い、ABI7700で定量RT-PCRを行っ

て、末梢血中におけるAngiopoietin-1 mRNAの発現量を測定した。プライマーおよびプローブには以下のものを使用し、GAPDHを内部標準とした。なお、下記プライマーおよびプローブの設定位置は、図2中のB.に示すとおりである。

センスプライマー-AngF272 : 5'-TTTGCAGAGAGGCACGGAA-3' (配列番号7)

アンチセンスプライマー-AngR389 : 5'-TATATCTTCTCCCACTGTTT-3' (配列番号8)

プローブ-Taq Man Probe : 5'-TTCCTCGCTGCCATTCTGACTCACATA-3' (配列番号9)

定量結果は、対内部標準比の相対量として算出し、Welch's t testにより統計処理した。図5は、健常者(control)およびRA患者の末梢血より抽出され、定量されたmRNAの発現量の平均値および標準偏差を示すグラフである。この結果を平均値±標準偏差として以下に示す。

健常者 : 0.3372 ± 0.2421

RA患者 : 0.0986 ± 0.0937

上記の結果より、RA患者は、健常者と比較してAngiopoietin-1 mRNAの発現量が有意に低いということが確認された。

したがって、上記の方法を用いてmRNAの発現量を測定することにより、RAを発症しているか否かの判定を行うことができる。具体的には、例えば、上記mRNAの発現量に対して2つの閾値(閾値1・閾値2)を設け、上記mRNAの発現量が上記閾値1以下であれば、RAを発症している可能性が高い、または将来発症する可能性が高いと判定し、上記閾値2以上であれば、RAを発症している可能性は低い、または将来発症する可能性は低いと判定することができる。なお、上記閾値1の値は、RA患者における平均値以下(すなわち0.0986以下)の値に設

定されることが好ましい。また上記閾値 2 の値は、健常者における平均値以上（すなわち 0.3372 以上）の値に設定されることが好ましい。

(5) Angiopoietin-1 遺伝子における 3 塩基挿入型（変異型）と 3 塩基欠失型（野生型）との生理機能の比較

続いて、Angiopoietin-1 遺伝子 (Ang1) において上記 3 塩基挿入を有する 3 塩基挿入型、及び上記 3 塩基が欠失した 3 塩基欠失型の生理機能を比較検討した。この生理機能の比較は、HUVEC 細胞の遊走能を以下に説明する方法で調べることによって実施した。

トランスウエル 24 穴 (Coster 社、#3422) の膜（ポアサイズ 8.0 μm ）に、最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトファイブロネクチン (BD 社、#354008) をコートした。本トランスウエルは、細胞の遊走能を調べるために 2 層になっており、上層に播種した細胞が膜を介して膜の下面に移動した数を、遊走細胞数としてカウントするものである。用意した上記トランスウエル 1 個に対して、100 μl の 1% BSA in M199 に懸濁した 2 万 5 千個の HUVEC 細胞を播種した。このトランスウエルに、1% BSA in M199 で 2 日間培養した、3 塩基挿入型 Ang1 あるいは 3 塩基欠失型 Ang1 をそれぞれ導入した SVS 細胞 (J. Mol. Cell. Cardiol., 29(8), 1997, 2177-2186 参照) の培養上清を 600 μl ずつ添加した。

6 時間培養後、定法により固定・染色し、膜の下面に遊走してきている細胞の数を 3 塩基挿入型、3 塩基欠失型それぞれについてカウントした。倒立顕微鏡を用いて、倍率 40 倍で 1 ウエルあたり 6 視野カウントし、その総計 (A) 及び平均 (B) を求めた。また、このカウントについては、6 ウエル分行い、平均値及び標準偏差を算出した。その結果を以下に示す。また、図 6 には、3 塩基挿入型 (Ang1)、3 塩基欠失型 (

Ang1(del3)) それぞれについて、遊走してきた細胞数の平均値を示す。

結果)

	平均値 (A/B)	標準偏差 (A/B)
3 塩基欠失型	260/43	41/7
3 塩基挿入型	520/87	81/14

上記の結果及び図 6 に示されるように、Ang1 に関して上記 3 塩基挿入を有する変異型では、HUVEC 細胞の遊走能が有意に亢進していることが確認された。この結果から、リウマチ型で見出された Ang1 の 3 塩基挿入型が健常型に比して血管新生をより亢進することで滑膜増殖の一因となっているということが考察される。

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

産業上の利用の可能性

以上のように、本発明によれば、変異を有する遺伝子またはタンパク質を利用して、その変異の有無を検出することにより、慢性関節リウマチの発病またはその発症可能性を高精度に簡便かつ確実に判定することができ、有用である。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな予防法、治療法および治療薬剤としても有用である。

請求の範囲

1. 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子。
2. 配列番号2に示される塩基配列を有し、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基挿入変異を持った請求の範囲1記載の遺伝子。
3. 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質。
4. 請求の範囲1または2に記載の遺伝子の変異の有無を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。
5. 請求の範囲3記載のタンパク質の変異の有無を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。
6. 請求の範囲4または5に記載の変異の有無を検出する方法を利用した慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定キット。
7. 配列番号2に示す塩基配列において、その配列中第805～807番目の塩基である「GGT」の3塩基を欠失した塩基配列を有する慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子由来のmRNAの発現量を測定することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。
8. 上記の判定方法は、上記mRNAの発現量に対して2つの閾値1、閾値2（但し、閾値1<閾値2）を設け、上記mRNAの発現量が上記閾値1以下であれば、慢性関節リウマチを発症している可能性が高い、

または将来発症する可能性が高いと判定し、上記閾値 2 以上であれば、慢性関節リウマチを発症している可能性は低い、または将来発症する可能性は低いと判定することを特徴とする請求の範囲 7 記載の慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

9. 請求の範囲 3 記載の変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者に、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードする DNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を補完することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。

10. 請求の範囲 3 記載の変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者の治療に用いられる治療薬剤であって、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードする DNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を主成分とする慢性関節リウマチの治療薬剤。

1/4

図 1

marker	Z0	Z1	Z2	Lod 値
D8S1762	0.25	0.50	0.25	0.00
D8S521	0.18	0.36	0.46	0.54
D8S1738	0.25	0.50	0.25	0.00
D8S556	0.13	0.26	0.61	1.35
D8S1830	0.16	0.31	0.53	0.84
D8S539	0.23	0.45	0.32	0.07

図 2

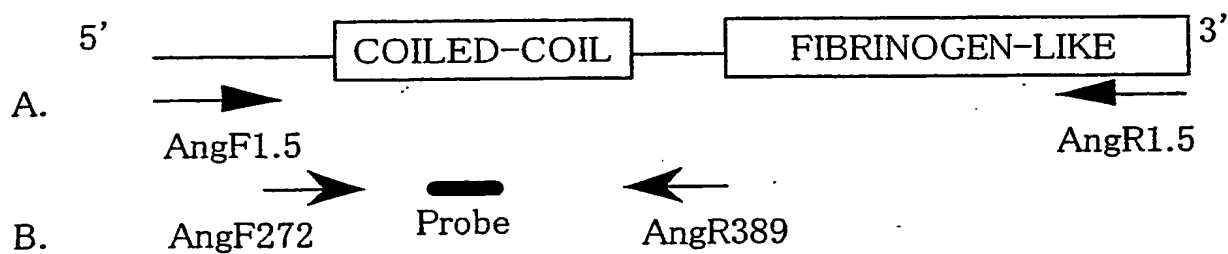


図 3 (a)

3塩基挿入

3' A A A C A C C T T C T T 5'

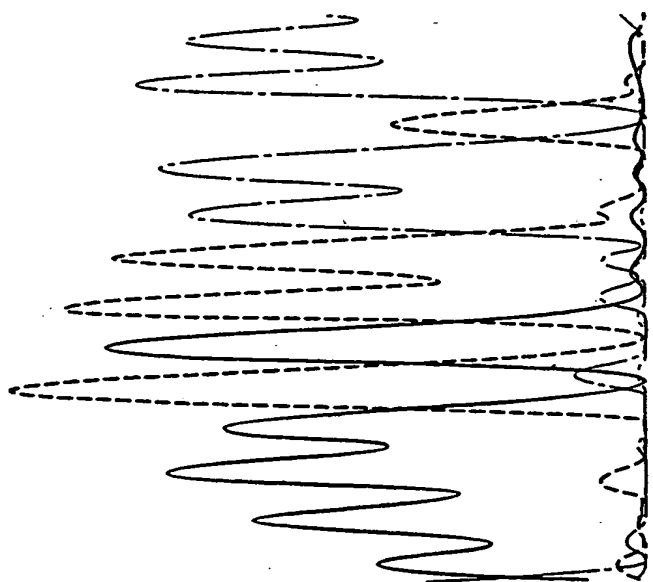
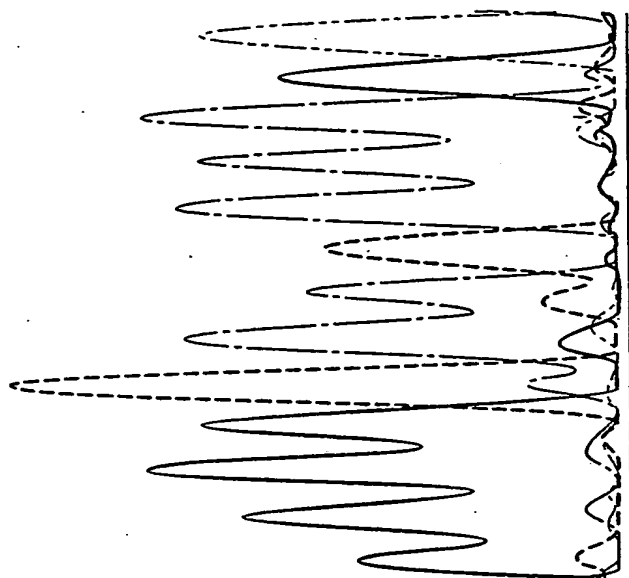


図 3 (b)

3塩基欠落

3' A A A C T T C T T T A G 5'



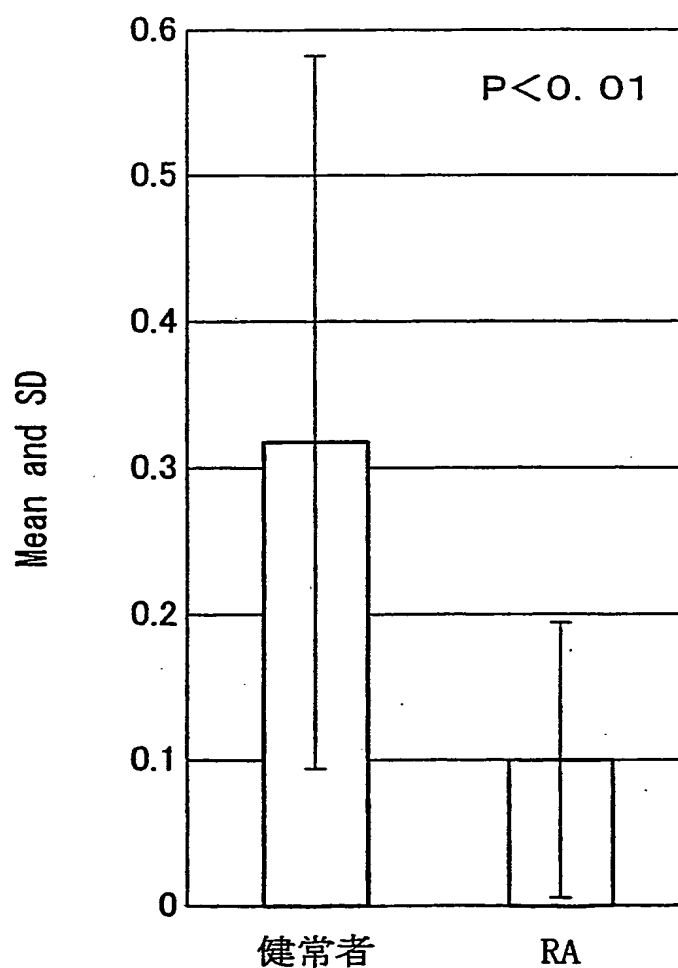
—	A
- - -	C
· · ·	T
· · ·	G

3/4

図 4

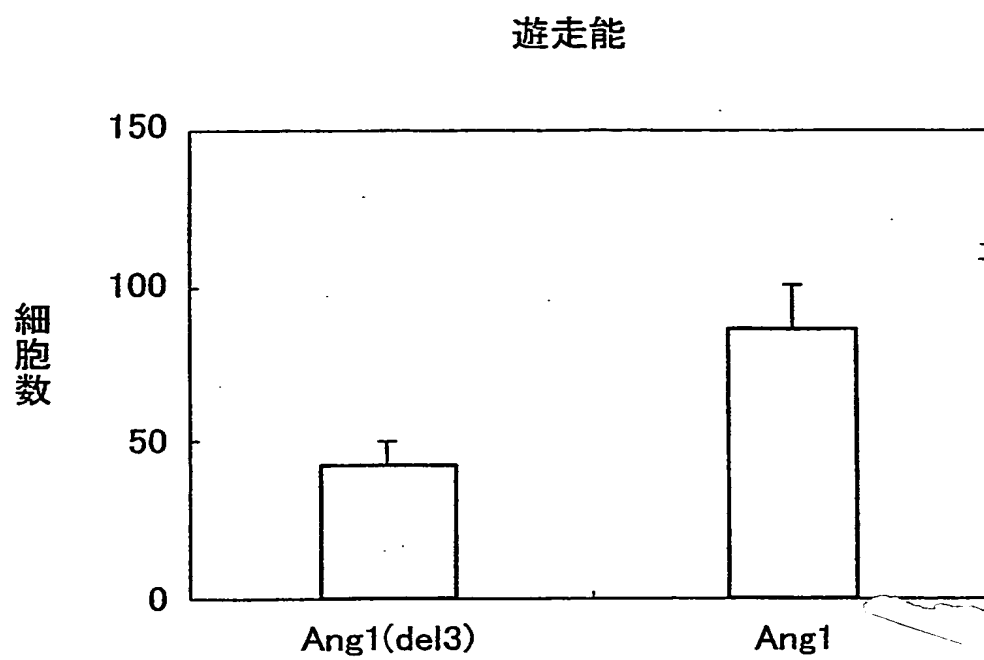
	n	nt805(del3) ホモ	nt805(del3) ヘテロ	nt805 ホモ
Familial RA	69	53 (76.8%)	15 (21.7%)	1 (1.5%)
Familial not RA	28	20 (71.4%)	8 (28.6%)	0 (0%)
Sporadic RA	225	170 (75.5%)	51 (22.7%)	4 (1.8%)
Sporadic not RA	383	353 (92.2%)	30 (7.8%)	0 (0%)

図 5



4/4

図 6



10/501259

DT04 Rec'd PCT/PTO 09 JUL 2004

<110> Shiozawa, Shunichi

<120> DNA structure and proteins responsible for the pathogenesis
of rheumatoid arthritis, diagnostic method of the disease,
diagnostic kit for detecting the disease,
treatment technique and curative medicine of the disease

<130> 0224

<150> JP 2002-005326

<151> 2002-1-11

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His

1

5

10

15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg

20

25

30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro

35

40

45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr

50

55

60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser

65

70

75

80

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp

85

90

95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met

100

105

110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu

115

120

125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys

130

135

140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu

145

150

155

160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln

165

170

175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser

180

185

190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu

195

200

205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr

210

215

220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala

225

230

235

240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp

245

250

255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu

260

265

270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp

275

280

285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile

290

295

300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn

305

310

315

320

Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp

325

330

335

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser

340

345

350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln

355

360

365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg

370

375

380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn

385

390

395

400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser

405

410

415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn

420

425

430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp

435

440

445

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala

450

455

460

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys

465

470

475

480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu

485

490

495

Asp Phe

<210> 2

<211> 1497

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
atgacagttt tcctttcctt tgctttcctc gctgccattc tgactcacat aggggtgcagc 60
aatcagcgcc gaagtccaga aaacagtggg agaagatata accggattca acatgggcaa 120
tgtgcctaca ctttcattct tccagaacac gatggcaact gtcgtgagag tacgacagac 180
cagtacaaca caaacgctct gcagagagat gctccacacg tggaaccgga tttctcttcc 240
cagaaacttc aacatctgga acatgtgatg gaaaattata ctcaagggtt gcaaaaactt 300
gagaattaca ttgtggaaaa catgaagtcg gagatggccc agatacagca gaatgcagtt 360
cagaaccaca cggctaccat gctggagata ggaaccagcc tcctctctca gactgcagag 420
cagaccagaa agctgacaga tgttgagacc caggtactaa atcaaacttc tcgacttgag 480
atacagctgc tggagaattc attatccacc tacaagctag agaagcaact tcttcaacag 540
acaaatgaaa tcttgaagat ccatgaaaaa aacagtttat tagaacataa aatcttagaa 600
atggaaggaa aacacaagga agagttagac accttaaagg aagagaaaga gaaccttcaa 660
ggcttgggta ctggtcaaac atatataatc caggagctgg aaaagcaatt aaacagagct 720
accaccaaca acagtgtcct tcagaagcag caactggagc tgatggacac agtccacaac 780
cttgtcaatc ttgacctaa agaaggtggt ttactaaagg gaggaaaaag agaggaagag 840
aaaccattta gagactgtgc agatgtatat caagctggtt ttaataaaag tggaatctac 900
actatttata ttaataatat gccagaacct aaaaagggtg tttgcaatat ggatgtcaat 960
gggggaggtt ggactgtaat acaacatcgt gaagatggaa gtctagattt ccaaagaggc 1020
tggaaggaa ataaaatggg ttttggaat ccctccggtg aatattggct ggggaatgag 1080
tttatttttg ccattaccag tcagaggcag tacatgctaa gaattgagtt aatggactgg 1140
gaagggaacc gagcctattc acagtatgac agattccaca taggaaatga aaagcaaac 1200
tataggttgt atttaaaagg tcacactggg acagcaggaa aacagagcag cctgatctta 1260
```

cacggtgctg atttcagcac taaagatgct gataatgaca actgtatgtg caaatgtgcc 1320
ctcatgttaa caggaggatg gtggtttgat gcttgtggcc cctccaatct aaatggaatg 1380
ttctatactg cgggacaaaa ccatggaaaa ctgaatggga taaagtggca ctacttcaaa 1440
gggcccagtt actccttacg ttccacaact atgatgattc gacctttaga tttttga 1497

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
oligonucleotide

<400> 3

gctggcagta caatgacag

19

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
oligonucleotide

<400> 4

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

<400> 5

caaccttgct aatctttgc

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

<400> 6

acaccttttt gggttctggc

20

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

<400> 7

tttgcgagag gcacggaa

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized
oligonucleotide

<400> 8

tatatcttct cccactgttt

20

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized
oligonucleotide

<400> 9

ttcctcgctg ccattctgac tcacata

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/515, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, 38/17, 48/00, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/515, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, 38/17, 48/00, A61P29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Database GenBank Accession No.U83508, 26 March, 1997 (26.03.97), DAVIS S. et al., Human angiopoietin-1 mRNA, complete cds., Cell, 1996, 87(7), p.1161-9	1-3/6,10
X/A	WO 00/64946 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 02 November, 2000 (02.11.00), Full text & US 6342219 B1 & US 634221 B1 & US 6416758 B1 & US 6524583 B1 & US 2002/0119153 A1 & EP 1179541 A1 & EP 1185559 A2 & JP 2002-543093 A	1-3/6,10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 April, 2003 (09.04.03)

Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00089

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 96/31598 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.), 10 October, 1996 (10.10.96), Full text & US 2002/0173627 A1 & EP 821728 A1 & JP 11-503323 A	1-3/6,10
X/A	WO 00/02587 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 20 January, 2000 (20.01.00), Full text & US 6312694 B1 & EP 1098665 B1 & JP 2002-520297 A	1-3/6,10
P,X P,A	WO 02/55692 A2 (RIBOPHARMA AG), 18 July, 2002 (18.07.02), Full text (Family: none)	1-3 6,10
P,X	Shun'ichi SHIOZAWA et al., "Shikkan Idenshi kara mita Jiko Men'eki Shikkan Hassho Kiko no Kenkyu", Experimental Medicine, 01 January, 2003 (01.01.03), Vol.21, No.1, pages 30 to 35	1-3,6,10
P,X	Shun'ichi SHIOZAWA et al., "Kansetsu Riumachi no Shikkan Kanren Idenshi to sono Kino", Japanese Journal of Clinical Medicine, 01 December, 2002 (01.12.02), Vol.60, No.12, pages 2269 to 2275	1-3,6,10
A	EP 1008648 A1 (SHIOZAWA, S.), 14 June, 2000 (14.06.00), Full text & WO 98/51791 A1 & JP 10-549018 A	1-3,6,10
A	EP 1164190 A1 (SHIOZAWA, S.), 19 December, 2001 (19.12.01), Full text & WO 00/56888 A1	1-3,6,10
A	SHIOZAWA, S. et al., Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis, Int.Immunol., 1998, 10(12), p.1891-5	1-3,6,10
A	SHIOZAWA, S. et al., An approach to identify new genes in autoimmune diseases: lessons from rheumatoid arthritis, Rev.Immunogenet., 2000, 2(1), p.133-9	1-3,6,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00089

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4-5, 7-9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 4 to 5, 7 to 9 pertain to diagnostic methods of the human body or methods for treatment and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/515, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, 38/17, 48/00, A61P29/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/515, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, 38/17, 48/00, A61P29/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Database GenBank Accession No. U83508, March 26, 1997, DAVIS S. et al., Human angiopoietin-1 mRNA, complete cds., Cell, 1996, 87 (7), p. 1161-9	1-3/6, 10
X/A	WO 00/64946 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2000. 11. 02, 全文 & US 6342219 B1 & US 6342221 B1 & US 6416758 B1 & US 6524583 B1 & US 2002/0119153 A1 & EP 1179541 A1 & EP 1185559 A2 & JP 2002-543093 A	1-3/6, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 04. 03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3447

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 96/31598 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 1996. 10. 10, 全文 & US 2002/0173627 A1 & EP 821728 A1 & JP 11-503323 A	1-3/6, 10
X/A	WO 00/02587 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2000. 01. 20, 全文 & US 6312694 B1 & EP 1098665 B1 & JP 2002-520297 A	1-3/6, 10
PX/PA	WO 02/55692 A2 (RIBOPHARMA AG) 2002. 07. 18, 全文(ファミリーなし)	1-3/6, 10
PX	塩沢俊一他, 疾患遺伝子からみた自己免疫疾患発症機構の研究, 実験医学, 2003. 01. 01, 第21巻, 第1号, p. 30-35	1-3, 6, 10
PX	塩沢俊一他, 関節リウマチの疾患関連遺伝子とその機能, 日本臨床, 2002. 12. 01, 第60巻, 第12号, p. 2269-2275	1-3, 6, 10
A	EP 1008648 A1 (SHIOZAWA S.) 2000. 06. 14, 全文 & WO 98/51791 A1 & JP 10-549018 A	1-3, 6, 10
A	EP 1164190 A1 (SHIOZAWA S.) 2001. 12. 19, 全文 & WO 00/56888 A1	1-3, 6, 10
A	SHIOZAWA S. et al., Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis, Int. Immunol., 1998, 10(12), p. 1891-5	1-3, 6, 10
A	SHIOZAWA S. et al., An approach to identify new genes in autoimmune diseases: lessons from rheumatoid arthritis, Rev. Immunogenet., 2000, 2(1), p. 133-9	1-3, 6, 10

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4-5, 7-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲4-5, 7-9は、人体の診断または処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。